مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۳، شماره ۳، سال ۱۳۹۶

پاسخ ارقام گلابی به حمله سویه‌های جهش‌یافته عامل بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*) بر اساس تولید پراکسیدهیدروژن

Reponse of Pear Cultivars to Invasion of Mutant Strains of Fire Blight Causal Agent (*Erwinia amylovora*) Based on H_2O_2 Generation

اعظم طاهری شهرستانی[۱]، حمید عبداللهی[۲]، باقر یخچالی[۳]، رحیم مهرابی[۴*] و امید عینی گندمانی[۵]

۱ و ۵- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
۲- دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳- استاد، گروه زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
۴- دانشیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۹

چکیده

طاهری شهرستانی ، ا.، عبداللهی ، ح.، یخچالی ، ب.، مهرابی ، ر.، و عینی گندمانی، ا. ۱۳۹۶. پاسخ ارقام گلابی به حمله سویه‌های جهش‌یافته عامل بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*) بر اساس تولید پراکسیدهیدروژن. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۳: ۳۳۳- ۳۱۵.**

درخت گلابی (*Pyrus communis*) مهم‌ترین میزبان بیماری آتشک است و واکنش ارقام گلابی نسبت به این بیماری تا حد زیادی به پاسخ‌های میزبان در رابطه با تولید گونه‌های فعال اکسیژن و به‌ویژه پراکسیدهیدروژن وابسته است. به منظور درک بهتر این واکنش، در تحقیق حاضر سطح کمّی تولید پراکسیدهیدروژن در ارتباط با نوع واکنش بافت ارقام گلابی در برهمکنش با سویه‌های شاهد باکتری *Erwinia amylovora* و جهش‌یافته‌های *hrp*N⁻، *hrp*W⁻ و *dsp*A/E⁻ در دو شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال در میزبان اندازه‌گیری شد. مقایسه نتایج شاخص‌های سرعت پیشرفت نکروز و سرعت و شدت تولید H_2O_2 در زمان‌های پس از آلودگی نشان داد که دو پروتئین مؤثره DspA/E و HrpN بیش‌ترین و HrpW کم‌ترین سهم را در بیماری‌زایی و تولید پراکسیدهیدروژن در میزبان داشتند و HrpN در برهمکنش با کلروپلاست میزبان نقش کلیدی داشت. ارزیابی کمّی تأثیر پروتئین‌های مؤثره باکتری روی شاخص‌های تولید پراکسیدهیدروژن نشانگر نقش مکمل پروتئین‌های مؤثره DspA/E و HrpN در ایجاد تنش اکسیداتیو در ارقام گلابی بود. به نظر می‌رسد تنش اکسیداتیو میزبان توسط پروتئین مؤثره HrpN ایجاد و با نقش تکمیلی DspA/E به سطح مخربی برای بافت‌های میزبان افزایش می‌یابد. بر اساس شاخص شدت تولید پراکسیدهیدروژن، توسعه این گونه فعال اکسیژن در میزبان به تنهائی برای ایجاد نکروز کافی نبوده و افزایش شدت به بالاتر از شاخص ۳، برای ایجاد نکروز و حساسیت ضروری است.

واژه‌های کلیدی: گلابی، پراکسیدهیدروژن، رادیکال آزاد اکسیژن، زنجیره انتقال الکترون، مقاومت اکتسابی سیستمیک.

نویسنده مسئول: h.abdollahi@areoo.ac.ir تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۲۵۴۱

* آدرس جدید: دکتر رحیم مهرابی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

مقدمه

درخت گلابی (.*Pyrus communis* L)، گیاهی متعلق به خانواده گلسرخیان (Rosaceae) بوده و در حال حاضر پس از سیب مهم‌ترین میوه دانه‌دار به شمار می‌آید (Anonymous, 2013). بیماری آتشک، با عامل باکتریایی *Erwinia amylovora*، مهم‌ترین بیماری درخت گلابی و سایر گیاهان خانواده گلسرخیان بوده و کشت و پرورش ارقام حساس این درختان را با مشکل جدی مواجه ساخته است (Norelli *et al*., 2003). در فرآیند حمله باکتری عامل بیماری آتشک به بافت‌های میزبان، سیستم ترشحی نوع III یکی از مؤلفه‌های اصلی بیماری‌زایی بوده (Zhao and Qi, 2011) و باکتری از این سیستم برای انتقال پروتئین‌های مؤثره بیماری‌زایی (Boureau *et al*., 2011) که مهم‌ترین آن‌ها HrpN، HrpW و DspA/E هستند، استفاده می‌کند (Oh and Beer, 2005). در این بین پروتئین HrpN با ایجاد واکنش فوق‌حساسیت در گیاهان غیر میزبان، سبب تخریب عملکرد میتوکندریایی شده و در نتیجه مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بافت‌های میزبان را در بر خواهد داشت (Xie and Chen, 2000). هارپین HrpW دارای یک Pectatelyase domain است که همولوگ پکتات لیاز نوع ۳ بوده و بر اساس برخی شواهد به طور جزئی برای بیماری‌زایی مورد نیاز است (Kim and Beer, 1995). پروتئین DspA/E نیز برای بیماری‌زایی باکتری ضروری است زیرا جهش در ژن مربوطه سبب ایجاد فنوتیپ غیربیماری‌زا و عدم رشد باکتری روی گیاه میزبان می‌شود (Bogdanove *et al*., 1998).

در بر همکنش سازگار و ناسازگار باکتری *E. amylovora* با گیاهان میزبان، انفجار اکسیداتیو (Oxidative burst) نقش مهمی در بیماری‌زایی باکتری در بافت‌های میزبان بر عهده دارد. انفجار اکسیداتیو فرآیندی است که طی آن تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) در بافت‌های گیاهی انجام شده و در صورت تجمع زیاد گونه‌های فعال اکسیژن در بافت‌ها، از طریق واکنش با مولکول‌های زیستی مختلف سبب آسیب‌های سلولی و نهایتاً نکروزه بافت می‌شوند(Rolke *et al*., 2004). همچنین نشان داده شده است که شروع انفجار اکسیداتیو در برهمکنش سازگار باکتری عامل بیماری آتشک با گیاهان میزبان، در نتیجه عملکرد تلفیقی دو پروتئین مؤثره HrpN و DspA/E است (Venisse *et al*., 2001).

در بین مراکز مختلف تولید گونه‌های فعال اکسیژن، مراکز واکنش فتوسیستم PSII) II) و فتوسیستم PSI) I) در تیلاکوئید کلروپلاست‌ها، به عنوان مکان‌های اصلی تولید این گونه‌های فعال شناخته شده‌اند (Asada, 2006). همچنین شواهدی مبنی بر نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در اثر متقابل باکتری *E. amylovora* با سلول‌های ارقام حساس و

مقاوم گلابی ارائه شده است (Abdollahi *et al.*, 2004). در مطالعه‌ای به منظور تعیین نقش زنجیره انتقال کلروپلاست در اثر متقابل باکتری- میزبان، نشان داد که استفاده از اوراسیل به عنوان بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست سبب کاهش میزان و زمان تولید پراکسیدهیدروژن در بافت‌های میزبان شده و احتمال تأثیر یکی از پروتئین‌های مؤثره باکتری روی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در طی فرآیند برهمکنش عامل بیماری با بافت‌های میزبان وجود دارد (Ghahremani, 2009). همچنین نشان داده شده که محل اثر پروتئین مؤثره باکتری در کلروپلاست، جایی نزدیک به محل احیای NADPH و در انتهای فتوسیستم I می‌تواند باشد (Erfaninia *et al.*, 2014)، اما تاکنون مشخص نشده کدام‌یک از این پروتئین‌های مؤثره باکتری سبب تأثیر روی کلروپلاست‌های میزبان و ایجاد انفجار اکسیداتیو حاصل از این ارگانل در میزبان می‌شوند.

از آن‌جایی که کلروپلاست‌ها محل شکل‌گیری تعدادی از مسیرهای مرتبط با سیستم دفاعی هستند، جای تعجب نیست که پروتئین‌های مؤثره بیمارگر، عملکردهای کلروپلاستی را هدف قرار داده و احتمالاً از سیگنال‌های دفاعی مشتق شده از کلروپلاست جلوگیری کنند. همچنین، گزارش شده که پروتئین مؤثره HrpN در تحریک دفاع اکتسابی سیستمیک میزبان نقش دارد (Oh and Beer, 2005). در مقابل نشان داده شده است که پروتئین مؤثره DspA/E از تحریک و فعالیت سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک پایه‌ای وابسته به اسیدسالیسیلیک جلوگیری کرده و به عنوان یک استراتژی بیماری‌زایی مهم برای آلودگی گیاهان میزبان، سبب مرگ سلول و ایجاد نکروز بافت‌ها می‌شود (DebRoy *et al.*, 2004).

مطالعات گوناگون، مؤید این مطلب است که کلروپلاست‌های میزبان، یکی از مراکز اثر متقابل با باکتری عامل بیماری آتشک بوده و زنجیره انتقال الکترون این ارگانل، از جمله منابع مهم تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در میزبان است (Abdollahi *et al.*, 2015). گرچه در مطالعات مختلف به بررسی اثر پروتئین‌های مؤثره مختلف باکتری عامل آتشک پرداخته شده اما تاکنون نقش دقیق این پروتئین‌ها از نظر سهم کمّی در بیماری‌زائی و تأثیر بر کلروپلاست‌های میزبان و تولید پراکسیدهیدروژن و ایجاد تنش اکسیداتیو مشخص نشده است، لذا این مطالعه، جهت درک بهتر برهمکنش نقش هر یک از پروتئین‌های مؤثره باکتری *E. amylovora* با کلروپلاست‌های میزبان انجام شد. همچنین با توجه به نقش دوگانه پراکسیدهیدروژن در ایجاد تحمل و ایجاد بیماری در بافت‌های میزبان، تلاش شد تا به تعیین سطح کمّی شدت تولید پراکسیدهیدروژن و نوع تأثیر آن روی بافت‌های میزبان در دو رقم گلابی پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

ارقام گلابی مورد استفاده شامل ارقام هروسوئیت (Harrow Sweet) نیمه مقاوم و رقم بارتلت (Bartlett) حساس بودند که به وسیله کشت شاخه‌چه به صورت درون‌شیشه‌ای تکثیر شدند (Leblay *et al.*, 1991). به این منظور، از محیط کشت QL (Quoirin and Lepoivre medium) به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر BAP (6-Benzylamino Purine)، یک میلی‌گرم در لیتر 2iP (6-ɣ-ɣ-(Dimethyl Allylamino)-Purine) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (Naphthalene Acetic Acid)، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۰/۸ درصد آگار و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر پکتین مرکبات برای پرآوری درون‌شیشه ارقام استفاده شد. شاخه‌چه‌های کشت شده، به اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی توسط لامپ‌های فلورسنت سفید و زرد (Sylvania, Germany)، با شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه و دمای شبانه‌روزی ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. شاخه‌چه‌ها هر ۴۵ روز یک‌بار واکشت شدند. شاخه‌چه‌های درون‌شیشه گلابی با طول حدود سه تا چهار سانتی‌متر که ۴۰ تا ۴۵ روز از واکشت آن‌ها گذشته بود، برای مایه‌زنی مورد استفاده قرار گرفتند.

جدایه‌های باکتریایی برای انجام مایه‌زنی، شامل سویه Ea273 باکتری *E. amylovora* تهیه شده از کشور آمریکا (American Type Culture Collection-ATCC49946) به عنوان شاهد یا تیپ وحشی (Wild type)، همراه با سویه‌های جهش‌یافته $hrpN^-$، DspA/E و $hrpW^-$ که به ترتیب در هریک از این سویه‌های جهش‌یافته، ژن‌های *hrp*N، DspA/E و *hrp*W مسئول تولید پروتئین مؤثره HrpN، DspA/E و HrpW، خاموش شده بود، استفاده شد. سویه‌های جهش‌یافته باکتری، از کشور فرانسه (CIRM-CFBP: International Centre for Microbial Resources, French) تهیه شده‌اند. برای تهیه مایه باکتری، هر یک از سویه‌های شاهد و جهش‌یافته به صورت شب‌گذران در محیط LB مایع (Liquid Luria Bertani medium)، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه روی شیکر انکوباتور کشت شدند. کدورت مایه باکتری، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimazu 1100, Japan) در طول موج ۶۰۰ نانومتر و با استفاده از بافر فسفات، روی عدد یک تنظیم شد. پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از مایه باکتری روی محیط کشت درون لوله آزمایش، شاخه‌چه روی محیط قرار داده شد و به این ترتیب شاخه‌چه‌ها به صورت تحتانی مایه‌زنی شدند (Abdollahi *et al.*, 2004).

برای ارزیابی پراکسید هیدروژن، ابتدا

شاخه‌چه‌های ارقام هروسوئیت و بارتلت، پس از پرآوری و واکشت، با طول حدود سه تا چهار سانتی‌متر، در دو محیط کشت دارا و فاقد ساکارز به روش تحتانی توسط تیمارهای مختلف باکتری‌های جهش‌یافته و شاهد مایه‌زنی شدند. برای هر تیمار سه تکرار درنظر گرفته شد و در بازه زمانی ۴۸۰ ساعت، هر ۴۸ ساعت یک بار (جمعاً به مدت ۲۰ روز) نمونه‌برداری انجام شد. در هر نمونه‌برداری، شاخه‌چه‌ها برای ارزیابی میزان تولید پراکسیدهیدروژن ناشی از باکتری، با استفاده از DAB (Diaminobenzidine، Sigma-Aldrich#8001) مطابق روش توردال-کریستنسن و همکاران (Thordal-Christansen *et al.*, 1997) رنگ آمیزی شدند. بدین منظور ابتدا محلول مادری ۲۵ میلی‌گرم DAB با حل کردن در HCl یک نرمال تهیه شد. کل طول شاخه‌چه به قطعات ۵ میلی‌متری تقسیم و در محلولی حاوی DAB ($1 \ mgml^{-1}$) و تریتون ۰/۱ ٪ (v/v) در آب مقطر و با pH برابر ۳/۸، در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری خیسانده شد. سپس، میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ الی ۴۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه، در دمای ۳۰ درجه در انکوباتور شیکردار قرار گرفتند. در مرحله بعد، قطعات ۵ میلی‌متری از هر تیوب بیرون آورده شدند و با اسکالپل به دو نیم تقسیم شده و زیر بینوکولر، فعالیت پراکسیدهیدروژن با تغییر رنگ استوانه مرکزی در ساعات مختلف، مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان تولید ROS بر اساس درجه شدت تغییر رنگ استوانه مرکزی از ۰ تا ۵ (صفر: شاهد، ۱: صورتی، ۲: قرمز، ۳: قرمز تیره، ۴: قهوه‌ای، ۵: قهوه‌ای تیره) اندازه‌گیری و سپس با استفاده از دو شاخص درصد و میانگین شدت تولید، بررسی شد. برای رسم نمودارها نرم‌افزار Microsoft Excel (Microsoft, USA-Version 2007) مورد استفاده قرار گرفت (Azarabadi *et al.*, 2016).

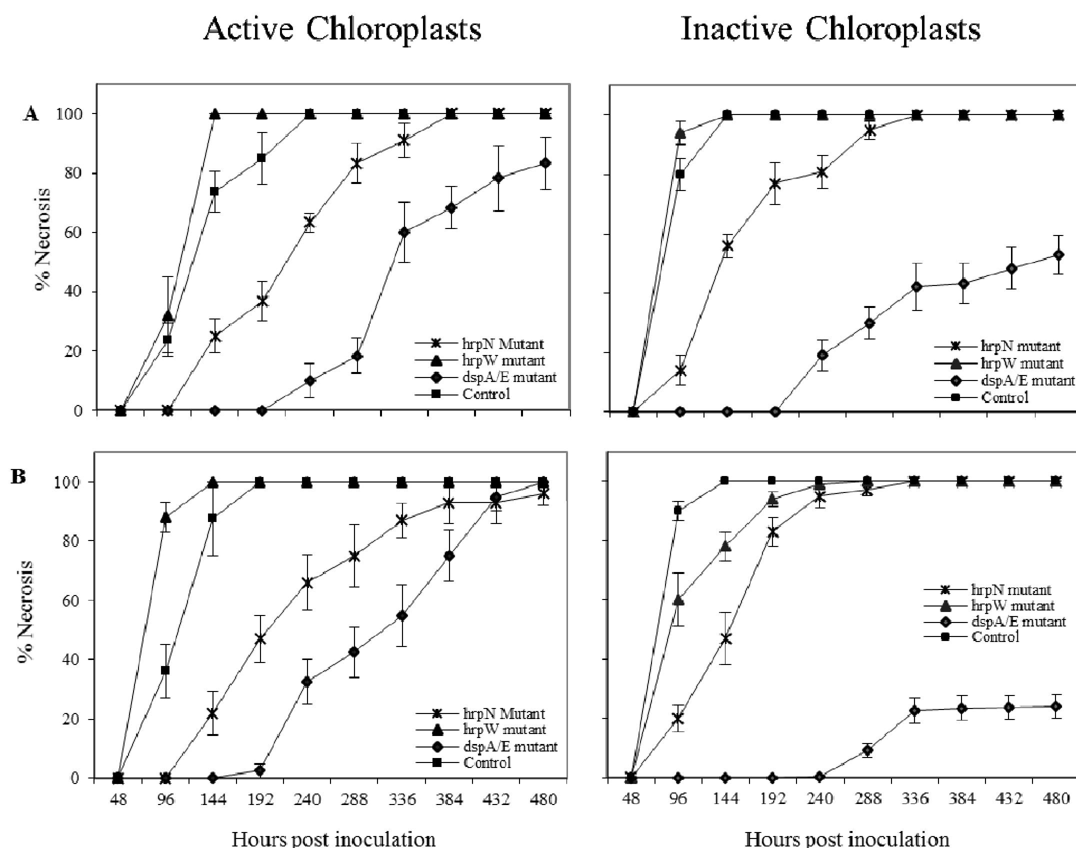
با توجه به تأثیر حضور ساکارز در محیط کشت گیاهی روی غیرفعال شدن زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست‌ها (Yabuta *et al.*, 2007) و در نتیجه از دست رفتن فعالیت فتوسنتزی و تولید ROS، کلیه ارزیابی‌ها در شرایط فوق در شرایط عدم حضور (محیط کشت فاقد ساکارز) و حضور ساکارز (محیط کشت دارای ساکارز) به ترتیب به عنوان شرایط کلروپلاست فعال و غیر فعال، بر اساس روش عبداللهی و همکاران (۲۰۱۵)، مورد مقایسه قرار گرفت. میزان پیشرفت نکروز در طول شاخه‌چه‌های درون‌شیشه با فواصل زمانی ۲۴ ساعت یک‌بار، و جمعاً به مدت ۴۸۰ ساعت (۲۰ روز) پس از آلوده‌سازی ارزیابی و ثبت شد. ارزیابی میزان پیشرفت نکروز به صورت درصد طول شاخه‌چه نکروزه بر اساس طول بخش نکروزه به طول کل شاخه‌چه، محاسبه شد. کلیه ارزیابی‌ها حداقل در پنج تکرار انجام شد و پس از ثبت داده‌ها در نرم‌افزار اکسل

(Microsoft, USA-Version 2007)، رسم نمودارها با همان نرم‌افزار انجام شد.

نتایج و بحث

ارزیابی پیشرفت نکروز

این تحقیق به منظور بررسی نقش کلروپلاست میزبان در دو حالت فعال و غیرفعال در ایجاد و پیشرفت بیماری به صورت نکروز و همچنین تولید پراکسید هیدروژن در برهمکنش با سویه‌های جهش‌یافته HrpN، HrpW و DspA/E در مقایسه با شاهد (آب مقطر) و شاهد باکتری وحشی (Ea273) انجام شد. مقایسه پیشرفت بیماری در طول شاخه‌چه‌های دو رقم حساس و متحمل نشانگر بروز علائم نکروز توسط کلیه سویه‌های عامل بیماری HrpN ، HrpW و DspA/E همراه با سویه شاهد وحشی Ea273 بود. همچنین در شاهد آب مقطر هیچ‌گونه بروز علائم اعم از آبگزیدگی و یا نکروز مشاهده نشد. مقایسه نتایج بروز نکروز نشان داد که از بین سویه‌های جهش‌یافته مورد استفاده در این تحقیق، سویه وحشی Ea273 و سویه جهش‌یافته HrpW دارای بیش‌ترین علائم بیماری بودند (شکل ۱). بر اساس این نتایج در ارقام تیمار شده با سویه جهش‌یافته HrpW ، نسبت به دوسویه جهش‌یافته دیگر، شروع علائم آبسوختگی و نکروز بیشترین شباهت را به باکتری شاهد داشت. به عبارتی دیگر عدم تولید پروتئین مؤثره HrpW، تفاوت زیادی در روند پیشرفت بیماری نداشته است. تفاوت‌های جزئی مشاهده شده در تأثیر پروتئین مؤثره HrpW روی میزبان به این صورت بود که سرعت پیشرفت نکروز در شاخه‌چه‌های تیمار شده با سویه جهش‌یافته HrpW در شرایط کلروپلاست فعال، به میزان محدودی سریع‌تر از سویه شاهد بود. در شرایط کلروپلاست غیرفعال تفاوت بین تأثیر سویه دارای توان تولید پروتئین مؤثره HrpW با سویه شاهد بسیار کم بود (شکل ۱). با توجه به نقش کلیدی گزارش شده کلروپلاست‌ها در فرآیند مقاومت به بیماری‌ها و خصوصاً نقش آن در دفاع اکتسابی سیستمیک (Asselbergh *et al.*, 2008)، می‌توان نقش محدود پروتئین مؤثره HrpW را به عنوان یک هارپین ثانویه روی تحریک سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک میزبان احتمال داد. به این صورت که در شرایط کلروپلاست فعال، امکان پیشرفت سریع‌تر علائم در شاخه‌چه‌های دو رقم فوق در اثر آلوده‌سازی با جهش‌یافته HrpW در مقایسه با شاهد وحشی، به دلیل عدم وجود HrpW در باکتری جهش‌یافته، امکان تحریک سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک وجود نداشته و پیشرفت علائم نکروز با سرعتی مشابه با سویه شاهد وحشی انجام شده است. در بررسی بیوانفورماتیک، با هدف تعیین اندامک هدف برای پروتئین‌های مؤثره باکتری *E. amylovora*، نرم‌افزار پردوتار (Predotar) هیچ توالی سیگنالی در ناحیه N-ترمینال پروتئین‌های مؤثره باکتری شامل HrpN،



شکل ۱- مقایسه پیشرفت نکروز ناشی از سویه‌های جهش‌یافته $hrpN^-$، $hrpW^-$ و $dspA/E^-$ باکتری *Erwinia amylovora* با سویه شاهد وحشی Ea273 در ارقام مختلف گلابی شامل: A) هروسوئیت؛ B) بارتلت، در شرایط کلروپلاست غیر فعال (راست) و کلروپلاست فعال (چپ)

Fig. 1. Comparison of necrosis development caused by $hrpN^-$, $hrpW^-$ and $dspA/E^-$ mutant strains of *Erwinia amylovora* against wild type strain Ea273 on two pear cultivars including: A) Harrow Sweet, B) Bartlett, through inactive chloroplast (right) and active chloroplast (left)

HrpW و DspA/E را شناسائی نکرد، در حالی که با استفاده از نرم‌افزار تارگت- پی (Traget-P) یک توالی سیگنال کلروپلاستی برای پروتئین مؤثره HrpW با احتمال ضعیف به دست آمد (Abdollahi, 2003). این نتایج نشان می‌دهد که در صورت اثبات ورود پروتئین HrpW به کلروپلاست‌های میزبان، بر اساس این شواهد این پروتئین مؤثره ممکن است نقش محدودی در تحریک سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک میزبان داشته باشد اما منطبق با گزارش‌های قبلی، نقش تأثیرگذاری روی بیماری‌زائی باکتری ندارد (Kim and Beer, 1995).

گیاهان تیمارشده با سویه HrpN در مقایسه با سویه‌های HrpW و سویه شاهد Ea273، دارای شدت علائم بیماری کمتر در هر دو رقم گلابی مورد استفاده و در هر دو شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال بودند. نتایج حاصل از این جهش‌یافته در ارقام مورد بررسی در شرایط کلروپلاست غیرفعال در مقایسه با فعال،

نشان‌دهنده تأخیر ۴۸ ساعته در بروز علائم اولیه بود (شکل ۱). مقایسه پیشرفت نکروز در دو محیط نیز نشان داد که علاوه بر شروع بیماری، روند پیشرفت آن نیز در صورت غیرفعال بودن کلروپلاست، بیش‌تر بود به گونه‌ای که در این شرایط، نکروز کامل ارقام مورد بررسی پس از گذشت ۱۳ روز مشاهده شد. در حالی‌که در شرایط کلروپلاست فعال، پیشرفت نکروز در ارقام مورد بررسی به صددرصد نرسید. در حالت کلی، مقایسه سرعت پیشرفت نکروز در ارقام مختلف گلابی با استفاده از سویه جهش‌یافته HrpN، در دو شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال در زمان‌های متناظر نشان دهنده کاهش نسبی سرعت پیشرفت نکروز در شرایط کلروپلاست فعال بود. کاهش سرعت پیشرفت علائم نکروز در طول شاخه‌چه‌های درون شیشه در تمامی شرایط و همچنین تأخیر در بروز اولین علایم نکروز در اغلب موارد با استفاده از سویه جهش‌یافته HrpN با توجه به نقش کلیدی گزارش شده پروتئین مؤثره HrpN روی ظهور و پیشرفت نکروز در میزبان توسط ونیسه و همکاران (Venisse *et al*., 2003)، نشان دهنده تطابق نتایج این بخش تحقیق با نتایج قبلی است. این نتیجه همچنین نشان‌دهنده این است که علاوه بر پروتئین مؤثره HrpN، سایر پروتئین‌های مؤثره باکتری نیز سهم قابل توجهی در بروز علائم نکروز داشته و حضور پروتئین مؤثره HrpN شرط لازم برای بروز نکروز نبوده و در کنار سایر پروتئین (های) مؤثره و به صورت موازی سبب شدت علائم بیماری می‌شود.

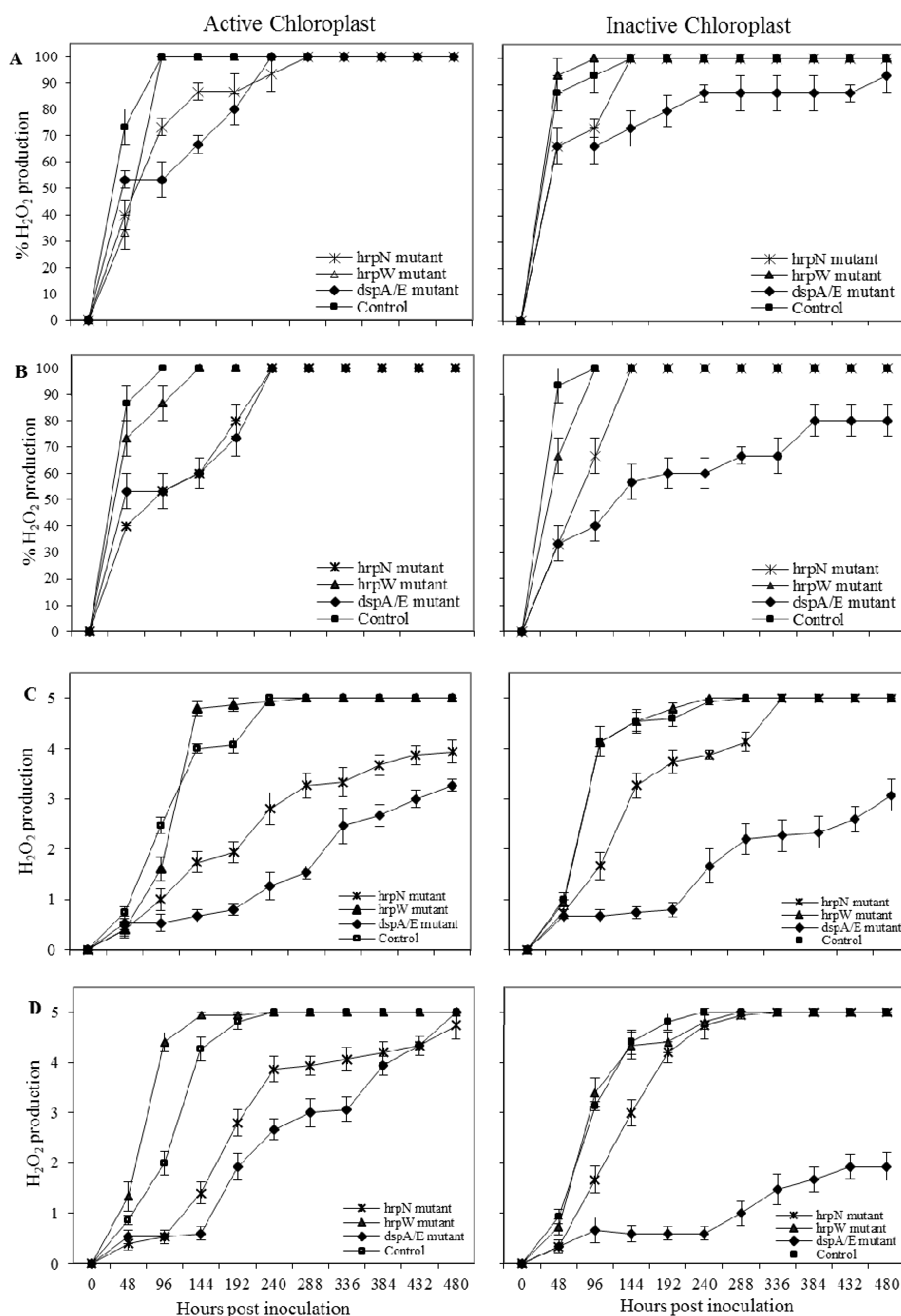
در ارقام گلابی تیمار شده با جهش‌یافته DspA/E، شروع و پیشرفت بیماری بسیار کندتر از سایر جهش‌یافته‌ها و همچنین باکتری شاهد در دو شرایط کلروپلاست فعال و غیر فعال بود. همچنین نتایج تیمار با این جهش‌یافته نشان داد که شروع بیماری و پیشرفت آن در شرایط کلروپلاست فعال نسبت به غیرفعال، بیش‌تر بود (شکل ۱). در کل نتایج حاصل از جهش‌یافته DspA/E، حاکی از نقش تأثیرگذارتر پروتئین مؤثره DspA/E در بیماری‌زایی باکتری *E. amylovora* حتی در مقایسه با دیگر پروتئین مؤثره این باکتری یعنی HrpN بوده است. مطالعات نشان داده که پروتئین DspA/E احتمالاً از طریق هدف قرار دادن کلروپلاست و جلوگیری از انتقال سیگنال و فتوسنتز، سبب تسهیل بیماری‌زایی می‌شود (Bonasera *et al*., 2006). از طرفی، مقایسه دو شاخص ظهور اولین علائم نکروز و سرعت پیشرفت نکروز در طول شاخه‌چه‌های درون شیشه ارقام بین دو سویه جهش‌یافته HrpN و DspA/E نشان داد که در هر دو شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال، تیمار با جهش‌یافته DspA/E تأخیر بیش‌تری در ظهور و پیشرفت علائم بیماری داشت. بر این اساس به نظر می‌رسد برخلاف گزارش‌های اولیه که پروتئین مؤثره HrpN را به عنوان اصلی‌ترین پروتئین مؤثره باکتری عامل بیماری آتشک برای تأثیر

روی بافت‌های میزبان معرفی کرده است (Wei *et al*., 1992)، پروتئین مؤثره DspA/E سهم مهم‌تری در مقایسه با HrpN در ایجاد نکروز و پیشرفت بیماری در میزبان بر عهده دارد. همچنین با توجه به اثر متضاد دو پروتئین مؤثره HrpN و DspA/E روی دفاع اکتسابی سیستمیک میزبان (DebRoy *et al*., 2004؛ Oh and Beer, 2005)، خاموش کردن کلروپلاست‌ها و افزایش شدت علائم بیماری با سویه شاهد وحشی و در مقابل فعال کردن کلروپلاست‌ها و کاهش علائم، نشان‌دهنده این است که نقش تحریک سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک توسط HrpN بر غیرفعالسازی آن توسط DspA/E غلبه یافته است.

تولید پراکسید هیدروژن در بافت‌های میزبان

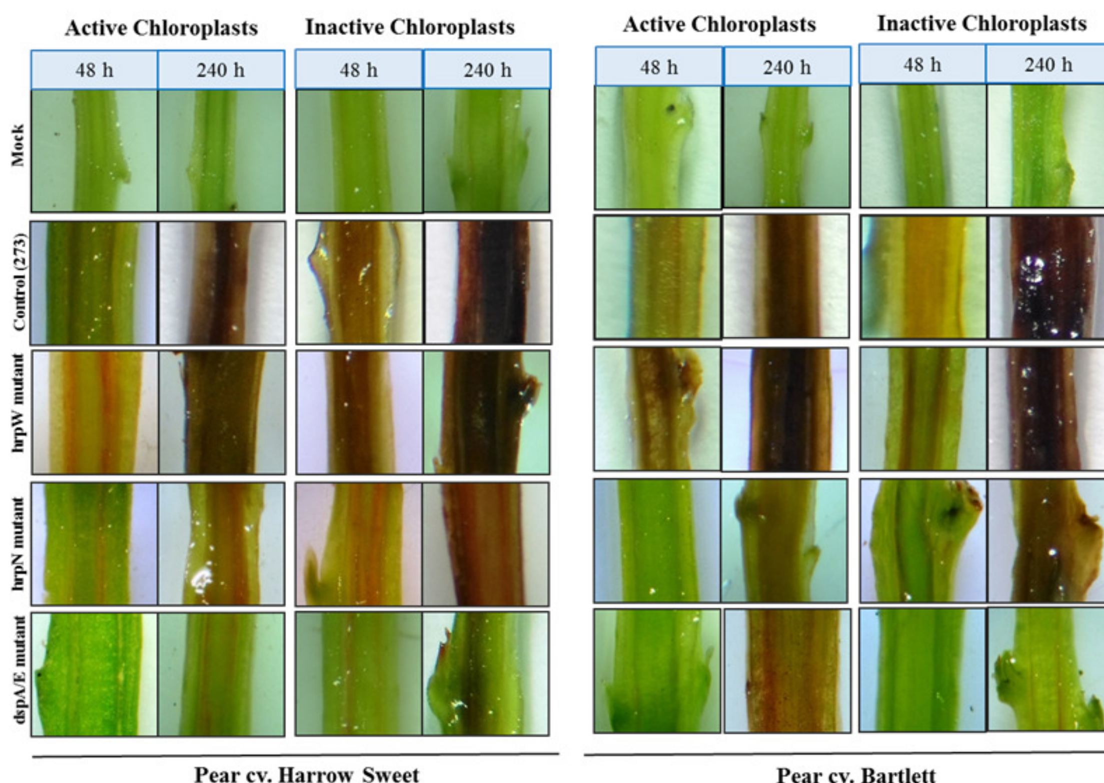
از فرآیندهای اصلی در برهمکنش باکتری *E. amylovora* با میزبان گلابی، انفجار اکسیداتیو در بافت‌های میزبان و تولید پراکسیدهیدروژن است (Venisse *et al*., 2003؛ Abdollahi *et al*., 2015). مقایسه نتایج تولید پراکسیدهیدروژن در اثر آلوده‌سازی ارقام مختلف گلابی با سویه‌های مختلف جهش یافته و شاهد باکتری *E. amylovora* در شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال نشان‌دهنده شروع سریع‌تر تولید پراکسیدهیدروژن نسبت به ظهور اولین علائم نکروز در بافت‌های میزبان بود (شکل ۲). به این صورت که اولین علائم نکروز پس از گذشت ۴۸ ساعت در بافت ارقام گلابی مشاهده شد، در صورتی که تولید گونه اکسیژن فعال پراکسیدهیدروژن از ساعات اولیه پس از آلوده‌سازی ارقام با کلیه سویه‌های مختلف جهش یافته و شاهد باکتری در بافت شاخه‌چه‌های میزبان قابل مشاهده بود (شکل‌های ۲ و ۳). دربرهمکنش عوامل بیماری‌زا با میزبان، به طور عموم تولید رادیکال سوپراکسید به عنوان اولین گونه فعال اکسیژن و پیش‌ساز تولید پراکسیدهیدروژن مطرح است (Bhattacharjee, 2011)، که متعاقب این امر پراکسیدهیدروژن به عنوان پیش‌ساز تولید انواع مخرب رادیکال فعال اکسیژن عمل کرده و نه تنها تولید پراکسید هیدروژن می‌تواند دارای نقش دفاعی در برابر حمله عوامل بیماری‌زا ایفا کند، بلکه در ایجاد نکروز در بافت‌های میزبان نیز می‌تواند مؤثر باشد (Rolke *et al*., 2004). لذا ظهور سریع‌تر پراکسیدهیدروژن قبل از ظهور علائم نکروز در بافت‌های میزبان، با توجه به لزوم تولید این گونه فعال اکسیژن و سپس تبدیل آن به رادیکال مخرب هیدروکسیل برای ظهور علائم، دور از انتظار نیست.

از سوی دیگر، نتایج بررسی میزان تولید پراکسیدهیدروژن نیز با نتایج پیشرفت نکروز حاصل از جهش‌یافته‌های مختلف و باکتری شاهد در دو شرایط کلروپلاست فعال و غیر فعال کاملاً منطبق بود (شکل‌های ۲ و ۳). همانند نتیجه پیشرفت نکروز ناشی از باکتری شاهد



شکل ۲- مقایسه سرعت (A و B) و شدت (C و D) تولید H_2O_2 ناشی از سویه‌های جهش‌یافته *hrp*N^{-}، *hrp*W^{-} و *dsp*A/E^{-} باکتری *Erwinia amylovora* با سویه شاهد وحشی Ea273 در ارقام مختلف گلابی شامل: A) هروسوئیت و B) بارتلت، در شرایط کلروپلاست غیر فعال (راست) و کلروپلاست فعال (چپ).

Fig. 2. Comparison of progression (A and B) and severity (C and D) of H_2O_2 production caused by *hrp*N^{-}, *hrp*W^{-} and *dsp*A/E^{-} mutant strains of *Erwinia amylovora* against wild type strain Ea273 on two pear cultivars including: A) Harrow Sweet, B) Bartlett, through inactive chloroplast (right) and active chloroplast (left).



شکل ۳- مقایسه پیشرفت تولید H_2O_2 در سرشاخه‌های درون‌شیشه ارقام گلابی هروسوئیت و بارتلت در شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال، در دو بازه زمانی ۴۸ و ۲۴۰ ساعت پس از آلوده‌سازی با سویه‌های مختلف باکتری *Erwinia amylovora*

Fig. 3. Comparison of *in vitro* H_2O_2 production in Harrow Sweet and Bartlett shootlets, through active and inactive chloroplast in 48 h and 240h after inoculation by three different strains of *Erwinia amylovora*

وحشی در میزبان که نشان‌دهنده کاهش نسبی پیشرفت نکروز در شرایط کلروپلاست فعال بود، بررسی شدت و سرعت تولید پراکسیدهیدروژن در گیاهان تیمارشده با باکتری شاهد وحشی نیز بیانگر کاهش هر دو عامل در شرایط کلروپلاست فعال در مقایسه با کلروپلاست غیرفعال در بازه‌های زمانی متناظر بود. با توجه به نقش تعیین کننده کلروپلاست‌ها در سطح تحمل به بیماری آتشک (Erfaninia *et al*., 2013)، و نقش این ارگانل در دفاع اکتسابی سیستمیک (Durrant and Dong, 2004) در این‌جا به نظر می‌رسد غیرفعال‌شدن کلروپلاست‌ها سبب تسریع در پیشرفت علائم در میزبان شده باشد. از طرفی در حالت کلروپلاست غیرفعال، افزایش بیماری مطابق با افزایش تولید پراکسیدهیدروژن بوده، لذا با توجه به نقش دوگانه پراکسیدهیدروژن در ایجاد حساسیت و

تحمل نسبت به بیماری‌های مختلف (Baker and Orlandi, 1995؛ Dias *et al.*, 2011)، به نظر می‌رسد در این‌جا این گونه فعال اکسیژن بیش‌ترین نقش را در افزایش شدت بیماری برعهده داشته است. در مورد تولید پراکسیدهیدروژن در گیاهان تیمار شده با جهش‌یافته HrpW، نتایجی مشابه با نتایج به دست آمده از شاهد در شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال به دست آمد که با توجه به نقش محدود پروتئین مؤثره HrpW باکتری در ایجاد و پیشرفت نکروز در میزبان، این نتیجه دور از انتظار نبود (شکل‌های ۲ و ۳).

داده‌های به دست آمده از این تحقیق همچنین نشان داد که در تیمار شاخه‌چه‌های ارقام گلابی تیمار شده با جهش‌یافته‌های HrpN و DspA/E تولید پراکسیدهیدروژن در مقایسه با شاهد وحشی و جهش‌یافته HrpW در رابطه با هر دو شاخص شدت و سرعت، در سطح پائین‌تری در هر دو شرایط کلروپلاست فعال و غیر فعال قرار داشت (شکل‌های ۲ و ۳). این نتایج با توجه به داده‌های قبلی به دست آمده مبنی بر نقش کلیدی دو پروتئین مؤثره HrpN و DspA/E در اثر متقابل باکتری عامل آتشک با میزبان و همچنین تحقیقات قبلی در انطباق است (Bogdanove *et al.*, 1998؛ Degrave *et al.*, 2008). از سوی دیگر داده‌ها نشان داد که بر اساس شاخص سرعت تولید پراکسیدهیدروژن، تقریباً در هر دو رقم بارتلت و هروسوئیت، میزان تولید این گونه فعال اکسیژن پس از گذشت ۴۸۰ ساعت از آلوده‌سازی، این شاخص به ۱۰۰ درصد و یا نزدیک به این مقدار رسید (شکل ۲). بر خلاف شاخص سرعت تولید پراکسیدهیدروژن، داده‌های شکل ۲ نشان‌دهنده این است که شاخص شدت تولید پراکسیدهیدروژن بین جهش‌یافته‌های HrpN و DspA/E و خصوصاً در سویه DspA/E، کاهش بیش‌تری نسبت به سویه شاهد و جهش‌یافته HrpW داشته است. در این تحقیق، در شرایط استفاده از سویه‌های جهش‌یافته پروتئین‌های مؤثره باکتری به دلیل اثر متفاوت آن‌ها روی شدت بیماری‌زائی و تحریک سیستم دفاع میزبان، نتایج دو شاخص شدت و سرعت پیشرفت پراکسیدهیدروژن در انطباق نبوده و لذا این دو شاخص می‌تواند کاملاً منطبق بر یک‌دیگر نباشد. این نتیجه برای اولین بار در شرایط استفاده از سویه‌های جهش‌یافته باکتری عامل بیماری آتشک در دو مکان ژنی HrpN و DspA/E به دست آمده است، در صورتی که در بررسی‌های انجام شده قبلی با سویه‌های وحشی این باکتری توسط عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al.*, 2015) و آذرآبادی و همکاران (Azarabadi *et al.*, 2016)، با توجه به عدم وجود سویه‌های جهش‌یافته، تفاوتی بین دو شاخص شدت و سرعت تولید پراکسیدهیدروژن گزارش نشد.

مقایسه داده سرعت پیشرفت پراکسیدهیدروژن نشان‌دهنده کاهش نسبی

سرعت پیشرفت این گونه فعال اکسیژن در شرایط کلروپلاست فعال در هر دو رقم هروسوئیت و بارتلت با استفاده از سویه جهش‌یافته DspA/E بود (شکل ۲-A و شکل ۲-B). مقایسه نتایج سرعت پیشرفت نکروز در دو شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال نشان‌دهنده تأثیر مثبت پروتئین مؤثره HrpN روی اندامک کلروپلاست میزبان در این اثر متقابل است. لذا انتظار می‌رود در شرایط استفاده از سویه جهش‌یافته DspA/E که تولید کننده پروتئین مؤثره HrpN به عنوان مهم‌ترین عامل ایجاد بیماری در این سویه جهش‌یافته محسوب می‌شود، در شرایط کلروپلاست فعال، این ارگانل به عنوان پایگاه اصلی تأثیر این پروتئین مؤثره عمل کرده و سطح تولید پراکسیدهیدروژن کاهش چندانی نشان ندهد (شکل ۲-A و شکل ۲-B). در حالی که بر اساس نتایج در شرایط کلروپلاست غیرفعال، پایگاه اصلی تأثیر پروتئین مؤثره HrpN یعنی کلروپلاست، غیرفعال شده و تولید گونه فعال اکسیژن پراکسیدهیدروژن، افت قابل توجهی نشان می‌دهد.

از سوی دیگر نتایج نشان‌دهنده عدم انطباق کامل دو شاخص سرعت و شدت پیشرفت پراکسیدهیدروژن در بافت‌های میزبان بود (شکل‌های ۲-A تا ۲-D). بر اساس این نتایج در مورد شاخص سرعت تولید پراکسیدهیدروژن پس از گذشت ۴۸۰ ساعت از آلوده‌سازی، تقریباً در تمامی شرایط آزمایش میزان پیشرفت این گونه فعال اکسیژن به ۱۰۰ درصد و یا نزدیک به آن بالغ بود، در حالی که در رابطه با شاخص شدت پیشرفت پراکسیدهیدروژن در مقایسه با سویه شاهد و جهش‌یافته HrpW همانند نتایج قبلی به دست آمده توسط عبداللهی و همکاران (۲۰۱۵) و آذرآبادی و همکاران (۲۰۱۶) با پیشرفت نکروز، به طور همزمان دو شاخص سرعت و شدت پیشرفت تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن از جمله پراکسیدهیدروژن افزایش نشان می‌داد. در صورتی که در این تحقیق استفاده از دو سویه جهش‌یافته HrpN و DspA/E نشان داد که الزاماً داده‌های شدت و سرعت تولید پراکسیدهیدروژن بر یک‌دیگر منطبق نیستند. از این نتایج چنین استنباط می شود که با توجه به اهمیت دو پروتئین مؤثره HrpN و DspA/E در انفجار اکسیداتیو بیماری و ایجاد نکروز، استفاده از هریک از جهش‌یافته‌های HrpN و DspA/E سبب شده تا در هر یک از جهش‌یافته‌ها یکی از اصلی‌ترین پروتئین‌های مؤثره باکتری حذف شود، لذا چنین برداشت می‌شود که وجود تنها یک پروتئین مؤثره در این سویه‌های جهش‌یافته سبب شده تا تولید پراکسیدهیدروژن با سرعت اندکی پائین‌تر نسبت به سویه شاهد در بافت‌ها توسعه پیدا کند، لیکن با توجه به عدم وجود دیگر پروتئین مؤثره در سویه‌های جهش‌یافته HrpN و DspA/E، شدت تولید این گونه فعال اکسیژن به میزان قابل‌توجهی افزایش پیدا نکند. بر این اساس، خصوصاً در شرایط کلروپلاست

فعال میزان افت شدت تولید پراکسیدهیدروژن در رابطه با هر دو سویه جهش‌یافته HrpN و DspA/E قابل توجه و در شرایط کلروپلاست غیرفعال، میزان کاهش شدت تولید پراکسیدهیدروژن در سویه جهش‌یافته DspA/E بیش‌تر بود (شکل ۲-C و شکل ۲-D).

در شرایط آلوده‌سازی با سویه جهش‌یافته DspA/E میزان افت شدت بیماری در شرایط کلروپلاست غیرفعال بسیار چشمگیر و به صورتی بود که حتی میزان پیشرفت نهائی بیماری به ۱۰۰ درصد بالغ نشد که این امر بیانگر اهمیت وجود کلروپلاست فعال در برهمکنش پروتئین مؤثره HrpN با سلول‌های میزبان در ایجاد بیماری است. از سوی دیگر نتایج شدت تولید پراکسیدهیدروژن در اثر متقابل میزبان با سویه جهش‌یافته DspA/E نشان‌دهنده بیش‌ترین کاهش شدت تولید این گونه فعال اکسیژن در این اثر متقابل در شرایط کلروپلاست غیرفعال بود و بر اساس نتایج قبلی و این نتیجه می‌توان این‌چنین جمع‌بندی کرد که پروتئین مؤثره HrpN به تنهائی سبب تجمع زیاد و افزایش میزان پراکسیدهیدروژن به سطوح بالاتر از شاخص ۳ نخواهد شد. از سوی دیگر وجود پروتئین مؤثره DspA/E به عنوان یک پروتئین مؤثره کمکی برای پروتئین مؤثره HrpN برای افزایش شدت تولید پراکسیدهیدروژن و رسیدن آن به شاخص ۵ ضروری است.

استفاده از سویه جهش‌یافته HrpN در رابطه با بروز علائم نشان‌دهنده توان این سویه برای ایجاد بیماری به میزان ۱۰۰ درصد طول شاخه‌چه‌های درون شیشه بود (شکل ۱) و بر اساس الگوی سرعت تولید پراکسیدهیدروژن نیز این گونه فعال اکسیژن در تمامی طول بافت شاخه‌چه‌های هردو رقم گلابی انتشار یافت (شکل‌های ۲ و ۳)، لیکن مقایسه الگوی شدت تولید پراکسیدهیدروژن در این شرایط با شرایط استفاده از سویه جهش‌یافته DspA/E نشان‌دهنده این بود که در شرایط استفاده از سویه جهش‌یافته DspA/E ، شدت تولید پراکسیدهیدروژن در اغلب موارد زیر شاخص ۳ و در حد کم‌تری نسبت به شرایط استفاده از سویه جهش‌یافته HrpN قرار داشت (شکل ۲). بر خلاف این، در شرایط استفاده از سویه جهش‌یافته HrpN ، شاخص شدت تولید پراکسیدهیدروژن به میزان قابل توجهی بالاتر بود، که این امر نشان می‌دهد که همانند نتایج قبلی پروتئین مؤثره DspA/E نقش کلیدی‌تر و مهم‌تری در ایجاد تنش اکسیداتیو و ایجاد بیماری در میزبان به همراه دارد. بر اساس بررسی نتایج شاخص سرعت پیشرفت نکروز در بافت ارقام گلابی مورد آزمایش و مقایسه آن با دو شاخص شدت و پیشرفت تولید پراکسیدهیدروژن تأیید می‌شود که انفجار اکسیداتیو (Venisse *et al.*, 2003)، به عنوان شاخص کلیدی اثر متقابل بین باکتری عامل بیماری آتشک و میزبان گلابی مطرح است. همچنین این گونه فعال اکسیژن به انواع مخرب‌تری نظیر رادیکال هیدروکسیل تبدیل

(Bhattacharjee, 2011) و سبب ایجاد نکروز خواهد شد. در بررسی آذرآبادی و همکاران (۲۰۱۶) تفاوت ارقام متحمل و حساس گلابی در تبدیل پراکسیدهیدروژن به رادیکال هیدروکسیل به عنوان یک مرحله کلیدی در تعیین حساسیت و یا تحمل ارقام تشخیص داده شد. لذا پراکسیدهیدروژن دارای نقش دوگانه در تعیین تحمل به بیماری (Baker and Orlandi, 1995) و همچنین نقش به عنوان پیش‌ساز تولید رادیکال هیدروکسیل در ایجاد نکروز دارد (Bhattacharjee, 2011). بررسی‌ها همچنین نشان می‌دهد که تاکنون مشخص نشده است که کدام سطح از تولید پراکسیدهیدروژن در ایجاد تحمل و کدام سطح آن سبب تولید رادیکال هیدروکسیل و ایجاد نکروز در بافت میزبان‌های بیماری آتشک از جمله درخت گلابی می‌شود. مقایسه نتایج نشان می‌دهد که بر اساس شواهد حاصل از این تحقیق تجمع پراکسیدهیدروژن تا سطح کمّی ۳ نمی‌تواند منجر به بروز پیشرفت کامل نکروز در بافت‌ها شود، این درحالی است که در همان زمان شاخص سرعت توسعه این گونه فعال اکسیژن در بافت ارقام گلابی به ۱۰۰ درصد رسیده بود. لذا می‌توان چنین جمع‌بندی کرد که بافت‌های ارقام گلابی در وهله اول همانند بسیاری از دیگر گیاهان نظیر توتون (Kong and Li, 2011) و آرابیدوپسیس (Launay *et al*., 2016)، از تجمع پراکسیدهیدروژن به منظور مهار بیماری و ایجاد سد دفاعی در مقابل توسعه باکتری مهاجم استفاده می‌کند. در چنین شرایطی فعالیت دو پروتئین مؤثره HrpN و به ویژه DspA/E و خصوصاً نقش کلیدی کلروپلاست‌ها در این اثرمتقابل، می‌تواند به افزایش سطح پراکسیدهیدروژن منجر شود. به این معنی که تأثیر پروتئین DspA/E سبب افزایش سطح پراکسیدهیدروژن از شاخص ۳ به سطوح بالاتر شده و احتمالاً به دلیل عدم توان بافت ارقام در مهار این میزان زیاد پراکسیدهیدروژن، نقش این گونه فعال اکسیژن از حالت دفاعی خارج و به پیش‌ساز تولید هیدروکسیل و ایجاد نکروز تبدیل خواهد شد. به نظر می‌رسد بر اساس نتایج این تحقیق، گامی در راستای شناخت بیش‌تر واکنش ارقام گلابی نسبت به حمله بیماری آتشک برداشته شد، لیکن پرسش اساسی در رابطه با چگونگی رفتار متفاوت ارقام متحمل و مقاوم در این گونه نسبت به حمله باکتری *E. amylovora* همچنان به قوت خود باقی است. لذا در ادامه این تحقیق لازم است مکانیسم‌های بازدارنده تولید زیاد پراکسیدهیدروژن و سیستم‌های بازدارنده و تسهیل کننده تبدیل این گونه فعال اکسیژن به رادیکال هیدروکسیل به عنوان مخرب‌ترین رادیکال مولد نکروز در ارقام مختلف گلابی مورد بررسی و شناسائی قرار گیرد.

References

Abdollahi, H. 2003. Molecular biology of interaction between *Erwinia amylovora* and pear (*Pyrus communis* L.) genotypes with different susceptibility to fire blight. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Florence, Italy.

Abdollahi, H., Ghahremani, Z., and Erfaninia, K. 2015. Role of electron transport chain of chloroplasts in oxidative burst of interaction between *Erwinia amylovora* and host cells. Photosynthesis Research 124: 231-242.

Abdollahi, H., Rugini, E., Ruzzi, M., and Muleo, R. 2004. *In vitro* system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. Plant Cell Tissue and Organ Culture 79: 90-95.

Anonymous 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. http: //faostat.fao.org/

Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology 141: 391-396.

Asselbergh, D., De Vleesschauwer, D., and Hofte, M. 2008. Global switches and fine-tuning: ABA modulates plant–pathogen defence. Molecular Plant-Microbe Interactions 21: 709-719.

Azarabadi, S., Abdollahi, H., Torabi, M., Salehi, Z., and Nasiri, J. 2016. ROS generation oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD) catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L.). European Journal of Plant Pathology 147: 279-294.

Baker, C. J., and Orlandi, E. W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. Annual Review of Phytopathology 33: 299-321.

Bhattacharjee, S. 2011. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. pp. 1-30. In: Dutta Gupta, S. (ed.) Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Bogdanove, A. J., Bauer, D. W., and Beer, S. V. 1998. *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (type III secretion) pathway. Journal of Bacteriology 180: 2244-2247.

Bonasera, J. M., Meng, X., Beer, S. V., Owens, T., and Kim, W. S. 2006. Interaction of DspE/A, a pathogenicity/avirulence protein of *Erwinia amylovora*, with pre-ferredoxin from apple and its relationship to photosynthetic efficiency. Acta Horticulturae 704: 473-477.

Boureau, T., Siamer, S., Perino, C., Gaubert, S., Patrit, O., Degrave, A., Fagard, M., Chevreau, E., and Barny, M. A. 2011. The HrpN effector of *Erwinia amylovora*, which is involved in type III translocation, contributes directly or indirectly to callose elicitation on apple leaves. Molecular Plant Microbe Interaction 24: 577-584.

DebRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y. B., Nomura, K., and He, S. Y. 2004. A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 101: 9927-9932.

Degrave, A., Fagard, M., Perino, S., Brisset, M. N., Gaubert, S., Laroche, S., Patrit, O., and Barny, M. A. 2008. *Erwinia amylovora* type three-secreted proteins trigger cell death and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant Microbe Interaction 21: 1076-1086.

Dias, C. V., Mendes, J. S., Dos Santos, A. C., Pirovani, C. P., Da Silva Gesteira, A., Micheli, F., Gramacho, K. P., Hammerstone, J., Mazzafera, P., and De Mattos Cascardo, J. C. 2011. Hydrogen peroxide formation in cacao tissues infected by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. Plant Physiology and Biochemistry 49: 917-922.

Durrant, W. E., and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology 42: 185-209.

Erfaninia, K., Abdollahi, H., and Khosroshahli, M. 2014. Effect of several chloroplast electron transport chain inhibitors on interaction of *Erwinia amylovora* with susceptible and tolerant apple and pear cultivars. Plant Pathology 49: 201- 214 (in Persian).

Erfaninia, K., Ghahremani, Z., and Abdollahi, H. 2013. Are chloroplasts key organelles for determining susceptibility of apple and pear genotypes to fire blight? Acta Horticulturae 1056: 295-305.

Ghahremani, Z. 2009. Evaluation of electron transport chain inhibitors and systemic acquired resistance (SAR) activator on fire blight development of host Plant. MSc. Thesis, Science and Research Branch, IslamicAzad University, Tehran, Iran. (in Persian).

Kim, J. F., and Beer, S. V. 1995. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectatelyases of a distinct class. Journal of Bacteriology 180: 5203-5210.

Kong, X., and Li, D. 2011. Hydrogen peroxide is not involved in HrpN from *Erwinia amylovora*-induced hypersensitive cell death in maize leaves. Plant Cell Reports 30: 1273.

Launay, A., Patrit, O., Wenes, E., and Fagard, M. 2016. DspA/E contributes to apoplastic accumulation of ROS in non host *A. thaliana*. Frontiers in Plant Science 7: 545.

Leblay, C., Chevrau, E., and Raboin, L. M. 1991. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 25: 99-105.

Norelli, J. L., Jones, A. L., and Aldwinckle, H. S. 2003. Fire blight management in the twenty-first century: using new technologies that enhance host resistance in apple. Plant Disease 87: 756-765.

Oh, C. S., and Beer, S. V. 2005. Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. FEMS Microbiology Letters 253: 185-192.

Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, S., Welting, K. M., Sievers, V., Tudzynski, B., and Tudzynski, P. 2004. Functional analysis of H_2O_2-generating systems in *B. cinerea*: The major Cu-Zn SOD (BCSOD1) has impact on virulence on bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. Molecular Plant Pathology 5: 17-27.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., and Collinge, D. B. 1997. Subcellular localization of H_2O_2 in Plants: H_2O_2 accumlation in papillae and hypersensitive response during the burley–powdery mildew interaction. The Plant Journal 11: 1187-1194.

Venisse, J. S., Barny, M. A., Paulin, J. P., and Brisset, M. N. 2003. Involvement of three pathogenicity factors of *Erwinia amylovora* in the oxidative stress associated with compatible interaction in pear. FEBS Letter 537: 198-202.

Venisse, J. S., Malnoy, M., Faize, M., Paulin, J. P., and Brisset, M. N. 2001. Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. Molecular Plant Microbe Interaction 15: 1204-1212.

Wei, Z. M., Laby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W., He, S. Y., Collmer, A., and Beer, S. V. 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science 257: 85-88.

Xie, Z., and Chen, Z. 2000. Harpin induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. Molecular Plant Microbe Interaction 13: 183-190.

Yabuta, Y., Mieda, T., Rapolu, M., Nakamura, A., Motoki, T., Maruta, T., Yoshimura, K., Ishikawa, T., and Shigeoka, S. 2007. Light regulation of ascorbate biosynthesis is dependent on the photosynthetic electron transport chain but independent of sugars in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany 58: 2661-2671.

Zhao, Y. F., and Qi, M. 2011. Comparative genomics of *Erwinia amylovora* and related Erwinia species-What do we learn? Genes 2: 627-639.